

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 10-075770

(43)Date of publication of application : 24.03.1998

(51)Int.Cl.

C12N 1/18
C12C 11/02
//C12N 1/18
C12R 1:865)

(21)Application number : 08-248484

(71)Applicant : ASAHI BREWERIES LTD

(22)Date of filing : 02.09.1996

(72)Inventor : FUNABASHI WATARU

(54) NEW YEAST AND ITS USE

(57)Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To obtain a hybridized yeast capable of imparting beer with well-brewed fragrance by hybridizing a monosporic separated strain originated from the yeast of refined Japanese sake (rice wine) with a monosporic separated strain originated from beer yeast.

SOLUTION: A monosporic separated strain originated from the yeast of refined Japanese sake (e.g. the monosporic separated strain of Kyokai 9 (IFO 2377) producing much fragrance of well-brewed sake) is hybridized with a monosporic separated strain originated from beer yeast (e.g. the monosporic separated strain of X yeast *Saccharomyces cerevisiae*) and a hybridized yeast having well-brewed fragrance is selected from the hybridized strains. This process gives a hybridized yeast capable of imparting beer with well-brewed fragrance, e.g. *Saccharomyces cerevisiae* KS7 (FERM P-15799) or *Saccharomyces cerevisiae* KS11 (FERM P-15800).

LEGAL STATUS

[Date of request for examination] 29.05.1998

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number] 3057557

[Date of registration] 21.04.2000

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

Copyright (C); 1998,2003 Japan Patent Office

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平10-75770

(43) 公開日 平成10年(1998) 3月24日

(51) Int.Cl. ⁸	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
C 1 2 N	1/18		C 1 2 N	1/18
C 1 2 C	11/02		C 1 2 C	11/02
// (C 1 2 N	1/18			
C 1 2 R	1:865)			

審査請求 未請求 請求項の数5 F D (全 9 頁)

(21) 出願番号	特願平8-248484	(71) 出願人	000000055 アサヒビール株式会社 東京都中央区京橋3丁目7番1号
(22) 出願日	平成8年(1996) 9月2日	(72) 発明者	船橋 互 東京都大田区大森北2-13-1 アサヒビ ール株式会社酒類研究所内
		(74) 代理人	弁理士 舟橋 榮子

(54) 【発明の名称】 新規酵母とその用途

(57) 【要約】

【課題】 新規な吟醸香を有する交雑酵母を得て、これを使用した吟醸香を有するビールの製造方法を提供する。

【解決手段】 清酒酵母由来の単胞子分離株とビール酵母由来の単胞子分離株とを交雑することによって得られた新規な吟醸香を有する交雑酵母。これを使用したビールの製造方法。

【特許請求の範囲】

【請求項1】清酒酵母由来の単胞子分離株とビール酵母由来の単胞子分離株とを交雑することによって得られた新規な吟醸香を有する交雑酵母。

【請求項2】清酒酵母である協会9号酵母由来の単胞子分離株とビール酵母であるX酵母（寄託申請中）の単胞子分離株とを交雑することによって得られた新規な吟醸香を有する交雑酵母。

【請求項3】 新規な吟醸香を有する交雑酵母、サッカロミセス セレビシエ (*Saccharomyces cerevisiae*) K S 7（工業技術院生命工学工業技術研究所受託番号 FER M P-15799）。

【請求項4】 新規な吟醸香を有する交雑酵母、サッカロミセス セレビシエ (*Saccharomyces cerevisiae*) K S 11（工業技術院生命工学工業技術研究所受託番号 FER M P-15800）。

【請求項5】 請求項1、2、3または4記載の新規な吟醸香を有する交雑酵母を使用することを特徴とする吟醸香を有するビールの製造方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、新規な吟醸香を有する交雑酵母及び当該酵母を利用した吟醸香を有するビールの製造方法に関する。

【0002】

【従来の技術】ビール醸造に用いられる酵母は、一般に麦汁の糖の主成分であるマルトースの取り込み能や発酵能が、清酒酵母やワイン酵母等の醸造用酵母に比べて特に高い一方で、高級アルコールやエステル類の生成は少ないことが特徴となっている（食品工業1987年2月号60-68）。ビール中の香気成分を増加させる方法としては、麦汁通気量の調整、麦汁の糖組成の変更、発酵温度の変更等が知られているが、いずれも吟醸香を特に増加させるものではない。

【0003】酵母の1倍体の交雑による芳香性の高い新規酵母を取得する出願として、特開平5-317034、特開平7-95877 がある。しかし、前者は清酒酵母の1倍体株を交雑し、清酒製造用に利用できる交雑酵母を得ることを目的としている。一方、後者は、ワイン酵母とサッカロミセス バヤヌス (*Saccharomyces bayanus*) という酵母とを交雑し、ワイン製造用に利用できる交雑酵母を得ることを目的としている。これに対し、ビールの香気を改良するために、清酒酵母とビール酵母を交雑させ、芳香性が高く、かつビールとしての発酵特性や風味を有する酵母の取得に関する報告は見当たらない。

【0004】

【発明が解決しようとする課題】一般に清酒に含まれる吟醸香の主成分である酢酸イソアミルやカブロン酸エチルは果実香や華やかな香りがし、飲んだ時にマイルドな味感を与える。しかしながら、清酒酵母はマルトースの

発酵性が低く、麦汁を用いた発酵試験では満足のいくビールは得られない。そこで、本発明は清酒酵母の特性を生かした吟醸香を有するビールを醸造することを目的とした。

【0005】

【課題を解決するための手段】本発明は、ビールに吟醸香を付与する酵母の取得を目的とするものであり、清酒酵母である協会9号（IFO 2377）の単胞子分離株とビール酵母の1種であるX酵母（寄託申請中）の単胞子分離株との交雑による吟醸香を有する交雑酵母である。

【0006】本発明は、また、得られた当該交雑酵母を使用する吟醸香を有するビールの製造方法である。清酒酵母である協会9号酵母サッカロミセス セレビシエ (*Saccharomyces cerevisiae*) は、(財)日本醸造協会又は(財)発酵研究所から分譲可能である。この協会9号酵母は、吟醸香を多く生成する酵母として吟醸酒醸造の際に広く用いられている酵母である。

【0007】ビール酵母の1種であるX酵母サッカロミセス セレビシエ (*Saccharomyces cerevisiae*) は、工業技術院生命工学技術研究所に寄託を申請中である。また、交雑により得られた交雑酵母のうち、有用な株はサッカロミセス セレビシエ (*Saccharomyces cerevisiae*) K S 7およびサッカロミセス セレビシエ (*Saccharomyces cerevisiae*) K S 11であり、工業技術院生命工学技術研究所に寄託して受託番号を得ている（受託番号：FERM P-15799、受託番号：FERM P-15800）。

【0008】本発明では、これらの協会9号酵母の単胞子分離株とビール酵母の1種であるX酵母の単胞子分離株とをともにして交雑を行い、交雑株の中から吟醸香を有する交雑酵母を選抜する。また、選抜した吟醸香を有する交雑酵母をビール醸造に使用して吟醸香や官能特性を試験し、実際にビール醸造に有効であることを確認した。

【0009】

【発明の実施の形態】協会9号酵母の単胞子分離株の取得は、協会9号酵母を通常の胞子形成培地で培養した後、Taniらの方法（J.Ferment.Bioengineering,69(3),184(1990)）に基づきランダム胞子分解によって得ることが出来る。ビール酵母の1種であるX酵母は単胞子分離株についても、同様の方法により得ることができる。

【0010】交雑法としては、例えばYPD寒天培地のような固形培地に両単胞子分離株を交差させて植菌し、培養後、交点に生育した菌体を得て、得られた菌体より単離したシングルコロニーから胞子形成能のあるものを2倍体として選択する方法が適用できる。得られた交雑株の優良株の選抜については、発酵性、香気成分の測定、官能評価等で行うことができる。発酵性については、例えば、発酵終了時の残エキス及び発酵前後の発酵液の重量差を測定することによって判定することができ

る。香気成分については、例えば、発酵終了時に発酵液の酢酸エチル、イソブタノール、酢酸イソアミル、イソアミルアルコール、酢酸 β -フェネチル、 β -フェネチルアルコール、カプロン酸エチル、カプリル酸エチル等の香気成分を測定することによって判定することが出来る。さらに、官能検査としては、例えば、吟醸香、香りの好み、ビールとしての好みを試験的に醸造したビールにおいて検査し、優良株を判定することが可能である。

【0011】また、本発明で得られた吟醸香を有する交雑酵母を、通常のビール製造法において使用し、清酒のように華やいだ香りを有するビールをつくることが可能である。

【0012】

【実施例】以下、実施例において、本発明を具体的に説明する。

1. 協会9号酵母の単胞子分離株の取得

協会9号酵母をYPD寒天培地(2%Peptone、1%Yeast Extract、2%グルコース、1.5%寒天)にて2~3日間25℃にて前培養した後、Macley胞子形成寒天培地(0.82%酢酸ナトリウム、0.1%グルコース、0.25%Yeast Extract、0.37%塩化カリウム、0.146%硫酸マグネシウム7水和物、1.5%寒天)に塗布して25℃にて7日間静置し、胞子を形成させた。胞子染色は、酵母菌体をスライドグラスに塗抹、風乾後火炎固定して、7.6%(W/V)マラカイトグリーン溶液にて10分間染色を行った。その後、0.25%サフラニン溶液にて対比染色を行い、顕微鏡にて観察した。

【0013】ランダム胞子分解は、Taniらの方法(J.Ferment.Bioengineering,69(3),184(1990))に従い、胞子を $10^7 \sim 10^8$ cells/mlとなるように細胞壁溶解バッファ

ー(0.6mg/ml Zymolyase20T、0.01M 2-メルカプトエタノール、0.6M塩化カリウム、66.7mMリン酸カリウムバッファー(pH7.5))に懸濁し、37℃で1時間反応させた。マイクロ遠心機にて15,000回転、5分間遠心後、上清を捨て、滅菌水に懸濁した。この操作を2回繰り返した後、60℃、20分間の熱処理を行うことにより栄養細胞のみを選択的に死滅させた。YPD寒天培地に塗布し、25℃にて生育してきたコロニーの中から、胞子染色により染色されなかったものを胞子分解株として選択し、35株を得た。

【0014】次に、接合能をもつ*Saccharomyces cerevisiae*の α 型株又は接合能をもつ*Saccharomyces cerevisiae*のa型株と接合能を試験し、接合能のあった21株(α 型17株、a型4株)を得た。得られた交雑株 α 型株に株番号を1から17、a型株に株番号18から21を付した。

【0015】2. ビール酵母の単胞子分離株との交雑
得られた協会9号酵母の単胞子分離株21株(α 型17株及びa型4株)と、接合能を有するビール酵母であるX酵母の単胞子分離株7株(a型4株、株番号A、B、C、Dと α 型3株、株番号E、F、G)とをYPD寒天培地に交差させて植菌し、25℃にて培養した後、交点に生育したコロニーから、胞子形成能のあるものを、交雑体として61株得た。表1に、ビール酵母X酵母の単胞子分離株と協会9号酵母の単胞子分離株との交雑結果による交雑株の取得状況を示したが、各酵母の交差する欄に交雑株が取得されたものについては株番号を示し、取得できなかったものについては×で示した。

【0016】

【表1】

	ビール酵母X酵母のa型株				
	株番号	A	B	C	D
協会9号酵母 α型株	1	101	201	301	401
	2	102	202	302	402
	3	103	203	303	403
	4	104	204	304	404
	5	105	205	305	405
	6	106	206	306	406
	7	107	207	307	×
	8	108	208	308	407
	9	109	209	×	408
	10	110	210	309	409
	11	111	211	310	410
	12	×	×	×	×
	13	×	×	×	×
	14	×	×	311	×
	15	112	×	312	×
	16	113	212	313	411
	17	114	213	314	412
	ビール酵母X酵母のα型株				
	株番号	E	F	G	
協会9号酵母 a株	18	×	501	601	
	19	×	502	602	
	20	×	503	603	
	21	×	504	—	

【0017】3. ビール醸造における発酵性試験による優良株の判定

ビールを醸造する上で、使用する酵母には旺盛な麦汁の発酵力が求められる。そこで、得られた61株の交雑株から麦汁発酵性に優れた株を選択することを目的として、100mlスケールにおける交雑株の発酵終了時の残エキスと発酵前後の発酵液の重量減少を調査した。すなわち、得られた交雑株を10ml YPD液体培地にて25℃で3日間振盪培養した後、培養液0.5mlを50mlビール麦汁に接種し、12℃で5日間静置し、慣らし培養を行った。本培養は、100mlビール麦汁を用い、初発酵母数 10×10^6 cells/mlとして、12℃で6日間静置培養を行った。発酵性の強弱については、発酵終了時の残エキス及び発酵前後の発酵液の重量差を測定することにより判定した。

【0018】その結果を、各試験の発酵前後の重量減少を横軸にとり、発酵終了時の残エキスを縦軸にとって図1に示した。ビール発酵中、糖は酵母により、アルコールと二酸化炭素に変換される。従って、発酵前後の発酵

液の重量減少が大きい程、マルトース発酵力の強い酵母であるといえる。また、発酵終了時の残エキスが少ないものほど、マルトース資化能が強いことが予想される。図1に示すように、協会9号酵母はマルトースの発酵力および資化能共に低いため、グラフの左上に位置した。また、ビール酵母であるX酵母は比較的右下に位置し、今回得られた交雑株はX酵母と同等或いはそれ以上のマルトースの発酵力および資化能を示すことが判った。

【0019】試験した61株の交雑株の殆どのが、協会9号酵母に比べると、発酵中のエキスの減少及び発酵前後の重量減少が大きく、ビール酵母X酵母に性質が近づいていることが明らかとなった。以上の結果から、ビール酵母X酵母と同等或いはそれ以上のエキスの減少及び発酵前後の重量減少を示す株のうち、発酵液の香気の良い21株(株番号: 103、104、105、107、113、114、201、202、206、207、301、302、303、308、309、310、311、312、314、401、504)を選択

した。

【0020】4. 交雑株を使用して醸造したビールの香気、官能特性

次に、選択した21株に対し、1L発酵試験に供し、吟醸香、その他の官能特性を試験した。交雑株を10ml、100ml及び500mlのように順次スケールアップして増殖させて集菌し、1Lビール麦汁に初発酵母数が 15×10^6 cells/mlとなるように添加して1Lシリンダーを用いて15℃にて6日間発酵させた。発酵終了時の発酵液の香気成分含量(単位はppm)を測定した。その結果、いずれの交雑

株も発酵経過にともなうエキスの減少はビール酵母X酵母と同様に良好であり、交雑により協会9号酵母の麦汁発酵性が改良されていることが確認された。得られた発酵液の香気成分含量について表2に示した。表中、ビール酵母X酵母よりも各香気成分を多く生成する交雑株が多数見受けられたが、中でも、一般的に吟醸香への寄与率が高いと考えられているカプロン酸エチルや酢酸イソアミルの増加が顕著であった。

【0021】

【表2】

菌株	酢酸 エチル	イソブ タノール	酢酸 イソアミル	イソアミル アルコール	酢酸β -フェネチル	β-フェネチル アルコール	カプロン 酸エチル	カプリル 酸エチル
ビール 酵母 X酵母	16.56	5.78	1.08	48.78	0.32	17.73	0.22	0.23
103	17.44	8.79	1.43	58.62	0.37	21.26	0.28	0.21
104	20.75	11.23	1.43	59.91	0.46	29.83	0.25	0.18
105	15.25	8.81	1.77	51.91	0.56	27.58	0.33	0.26
107	20.81	12.58	2.65	68.64	0.91	34.06	0.29	0.23
113	14.32	11.86	1.16	62.46	0.39	31.62	0.24	0.20
114	24.57	14.11	2.60	69.76	0.60	24.81	0.41	0.25
201	18.65	6.70	1.54	46.91	0.32	18.37	0.52	0.35
202	15.74	6.39	1.36	46.04	0.35	18.45	0.50	0.36
206	17.64	8.21	1.45	52.15	0.29	18.81	0.60	0.39
207	23.26	10.27	2.98	65.53	0.68	24.85	0.42	0.38
301	15.63	3.66	1.50	38.66	0.28	10.86	0.73	0.39
302	13.53	5.26	1.16	37.27	0.25	12.29	0.44	0.62
303	15.50	4.70	1.36	44.52	0.36	15.54	0.53	0.52
308	22.44	5.06	1.80	40.99	0.42	15.01	0.45	0.55
309	14.20	4.34	1.26	40.86	0.30	12.83	0.50	0.44
310	12.94	3.76	0.96	36.27	0.17	8.59	0.49	0.56
311	13.30	5.61	0.96	42.63	0.22	15.00	0.46	0.48
312	19.90	5.73	1.34	43.33	0.26	13.71	0.53	0.51
314	14.73	5.77	1.46	48.70	0.35	16.98	0.54	0.54
401	18.93	7.84	1.51	51.27	0.45	19.93	0.46	0.42
504	9.62	5.69	0.48	44.38	0.14	14.70	0.40	0.51

【0022】交雑株試醸ビールの官能評価の結果は表3に示した。官能評価はパネリスト6～9名により、吟醸香、香りの好み及びビールとしての好みについて、5点満点の5段階で評価した。結果から明らかなように、交雑株を用いて発酵させたビールの吟醸香の評点は高く、

パネリストのコメントもエステル香といった香気成分含量の増加に起因すると考えられる評価が多く見受けられた。

【0023】

【表3】

菌株	吟醸香	香りの好み	ビールとしての好み
ビール酵母X酵母	2.0	3.0	3.0
103	2.0	2.9	2.4
104	2.3	2.9	2.9
105	2.6	2.9	2.6
107	3.6	3.0	2.9
113	2.4	2.9	2.9
114	4.1	3.9	3.6
201	4.0	3.1	3.3
202	3.4	2.7	2.1
206	3.4	3.0	2.3
207	3.7	3.7	3.1
301	3.1	2.4	2.4
302	4.0	3.2	3.0
303	2.5	2.7	2.5
308	2.7	2.5	2.5
309	3.0	3.2	3.0
310	3.7	3.2	3.3
311	3.0	3.2	3.2
312	3.3	3.0	3.0
314	3.2	2.8	2.8
401	3.0	3.2	3.2
504	2.2	2.3	2.5

【0024】以上の結果から、吟醸香の評点が高く、香りの好み並びにビールとしての好みの評点も良好であった114および207の2株を選択した。

5. パイロットプラント試験

次に選択した2株について、実際のビール醸造に近いパイロットプラントスケールにおける試験醸造を行った。方法は100Lのビール麦汁を用い、初発酵母数が 10×10^6 cells/mlとなるように添加し、15℃にて6日間発酵させた。発酵経過に伴うエキスの減少を図2に示した。また、発酵経過に伴う浮遊酵母数の変化を図3に示した。114および207の残エキスおよび酵母数でみた発酵経過は、対照のビール酵母であるX酵母と同様の傾向を示し、ビール酵母であるX酵母の発酵状態と比較しても何ら遜色は認められなかった。

【0025】交雑株試験ビールの香気成分に関しては、前記ビール酵母の各香気成分生成量を1とした時の、交

雑株の香気成分生成量をレーダーチャートにして図4に示した。図4にはビールの香気成分含量を評価する際に通常測定している高級アルコール類或いはエステル類について、X酵母と比較した場合、何倍の香気成分を生成したかを示した。両者とも吟醸香の主成分であるカプロン酸エチル（リンゴ様香気）および酢酸イソアミル（バナナ様香気）の増加が認められたが、特に、114株は酢酸イソアミル、207株はカプロン酸エチルを多く生成する傾向にあった。

【0026】実際の分析値を表4に示したが、114株の酢酸イソアミルは3.2ppm、207株のカプロン酸エチルは1.3ppmと、閾値と比較してもビールとしてはかなり高い値であった。

【0027】

【表4】

パイロット試験ビールの香気成分含量 (ppm)				
	X酵母	114	207	閾値*
酢酸エチル	24.6	27.4	22.0	30
イソブタノール	5.4	12.0	9.6	175
酢酸イソアミル	1.7	3.2	2.4	2
イソアミルアルコール	48.3	74.8	67.6	75
酢酸 β -フェネチル	0.4	0.6	0.3	3
β -フェネチルアルコール	13.9	17.1	11.1	75
カブロン酸エチル	0.5	0.9	1.3	0.3
カプリル酸エチル	0.5	0.5	0.7	1

*: Harrison et al. J.Inst.Brew., 76(1970)486

【0028】さらに、交雑株を用いたビールの官能検査の結果を図5に示したが、吟醸香に関しては、いずれの株もビール酵母X酵母に比べて評点が高く、香気成分含量の結果をよく反映しているものと考えられた。香りの好み及びビールとしての好みに関しては、114株や207株ではビール酵母のX酵母と同等の評点を得た。繰り返し使用した場合の発酵経過、香気成分含量及び官能検査の結果は全ての株で同様の傾向が認められ、114株及び207株は再現性良く良好な結果を得たので、両株を最終的に選択し、吟醸香を有するビール酵母交雑株、サッカロミセス セレビシエ (*Saccharomyces cerevisiae*) KS7、サッカロミセス セレビシエ (*Saccharomyces cerevisiae*) KS11として最終決定した。

【図面の簡単な説明】

【図1】 実施例における交雑株の麦汁発酵性について、各試験の発酵前後の重量減少を横軸に、発酵終了時の残エキスを縦軸にとって示したグラフ。

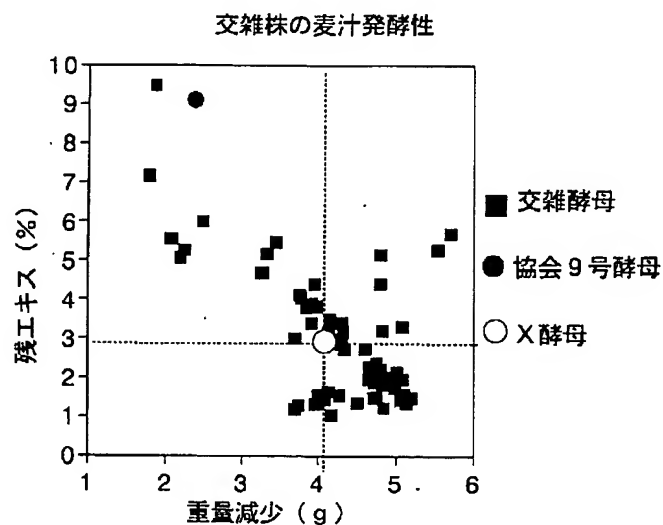
【図2】 実施例における発酵経過に伴うエキスの減少について、発酵日数(日)を横軸に、エキス(%)を縦軸にとって示したグラフ。

【図3】 実施例における発酵経過に伴う浮遊酵母数の変化について、発酵日数(日)を横軸に、酵母数($\times 10^6$ cells/ml)を縦軸にとって示したグラフ。

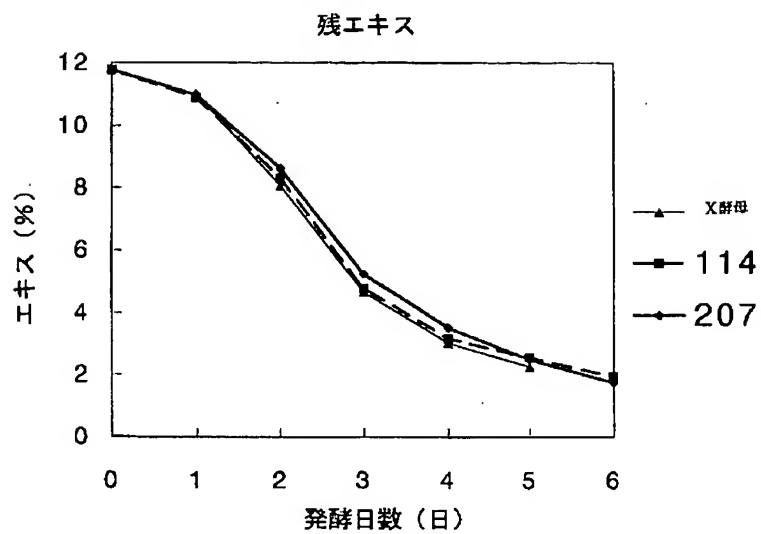
【図4】 実施例における交雑株試験ビールの香気成分に関して、ビール酵母の各香気成分生成量を1とした時の、交雑株の香気成分生成量を示すレーダーチャート。

【図5】 実施例における交雑株を用いたビールの官能検査の結果を示すグラフ。

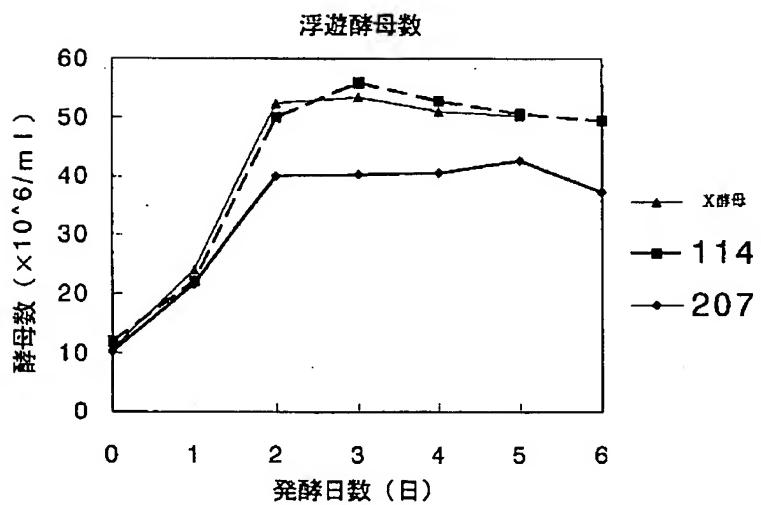
【図1】



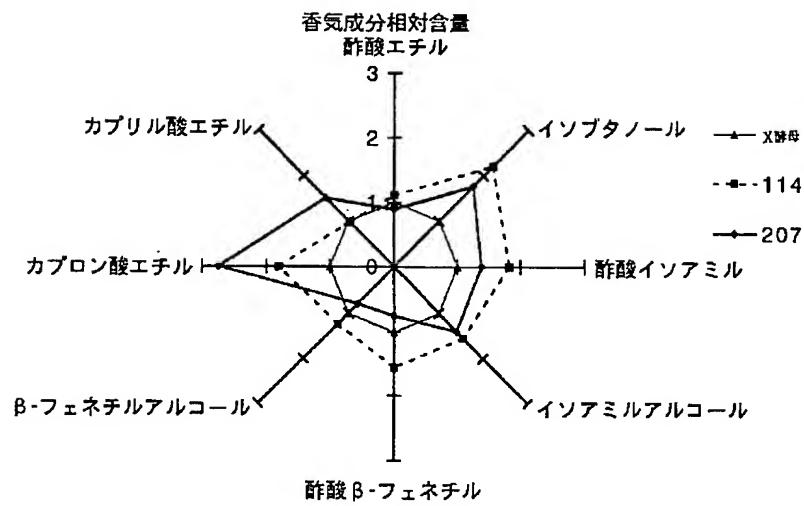
【図2】



【図3】



【図4】



【図5】

